

Angiogeneesi ja lymfangiogeneesi kielen levyepiteelikarsinoomissa.

LK Konsta Pohjola

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Patologian osasto

02/2015

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Patologian osasto

Konsta Pohjola: Angiogeneesi ja lymfangiogeneesi kielen levyepiteelikarsinoomissa.

Kirjallinen työ, 10 s.

Ohjaajat: Professori Timo Paavonen, dosentti Sanna Toppila-Salmi

Helmikuu 2015

Avainsanat: syöpä, podoplaniini, CD34, metastaasi

Angiogeneesi ja lymfangiogeneesi kielen levyepiteelikarsinoomissa

Kielen levyepiteelikarsinooma on yksi tavallisimpia suuontelon kasvaimista. Jo aikaisessa vaiheessa se saattaa metastasoida erityisesti kaulan alueen imusolmukkeisiin. Angiogeneesillä ja erityisesti lymfangiogeneesillä on ajateltu olevan suuri merkitys kasvaimen leviämisen paikallisesti, sekä metastasoinnille. Tutkimuksessa pyrimme selvittämään onko malignien ja premalignien tuumoreiden välillä eroa imu- ja hiussuonien tiheyksissä.

Tutkimusaineisto koostui kielestä otetuista levyepiteelikarsinoomanäytteistä ja näiden kaulan alueen imusolmukkeiden metastaaseista, sekä kielestä otetuista hyperplasia- ja dysplasianäytteistä.

Näytteet värjättiin immunohistokemiallisesti CD34:llä (verisuonet), sekä D2-40:llä ja Podoplaniinilla (imusuonet). Näytteet evaluoitiin siten, että kustakin kielikarsinooma- ja metastaasi, sekä hyperplasia- ja dysplasianäytteestä arvioitiin mikroskooppitarkastelussa viisi (5) hotspottia, joissa oli arviolta eniten suonia ja näiden alueiden suonet laskettiin. Näiden hotspottien keskiarvoja vertailimme SPSS 13.0-ohjelmalla.

Tulostemme perusteella merkittävää eroa imu- ja hiussuonien tiheyksissä ei ollut havaittavissa malignien ja premalignien kasvainten välillä. Imu- ja hiussuonien merkitystä kielen levyepiteelikarsinooman metastastastointiin ja ennusteeseen tulisi jatkossa tutkia lisää.

Sisällys

1 Johdanto.....	4
1.1 Kielikarsinooma.....	4
1.2 Angiogeneesi ja lymfangiogeneesi.....	4
1.3 Tutkimuksen tavoitteet.....	5
2 Aineisto ja menetelmät.....	5
2.1 Aineisto.....	5
2.2 Menetelmät.....	6
3 Tulokset.....	6
3.1 Angiogeneesi.....	6
3.2 Lymfangiogeneesi.....	7
4 Pohdinta.....	7
5 Lähteet.....	10

1 JOHDANTO

1.1 Kielikarsinooma

Kielen levyepiteelikarsinooma on suun alueen yleisimpiä syöpiä. Kielisyöpien esiintyvyys vaihtelee maittain. Suomessa vuonna 2008 miesten kielisyövän ikävakioitu ilmaantuvuus sataatuhatta henkilövuotta kohden oli 1.9 ja naisten vastaava luku oli 1.3. (1)

Kielisyövän, kuten muidenkin syöpien, varhainen tunnistaminen on olennaista ennusteen kannalta. Usein suusyöpä on alkuvaiheessaan vähäoireinen ja voi lähettää etäpesäkkeitä jo varhain. Kielisyövän riskitekijöitä ovat alkoholinkäyttö, tupakointi, eräät limakalvomuutokset, kuten Lichen planus ja leukoplakia sekä HPV-infektio. Kielisyövän hoito on kirurginen. Tarpeen vaatiessa hoitoon voidaan liittää myös sädehoito, johon usein yhdistetään solusalpaajalääkitys mikäli kyseessä on levinnyt tauti. (2)

Kliinisesti kielikarsinooman ennusteeseen heikentävästi vaikuttavina tekijöinä on pidetty kaulan imusolmukemetastaasien esiintymistä, karsinooman relapsia sekä samanaikaista toisen primäärikasvaimen kehittymistä. Sosiodemografisten tekijöiden (ikä, sukupuoli, rotu, elämäntavat) ennusteellisesta merkityksestä on käyty keskustelua, mutta selkeää konsensusta ei toistaiseksi ole saavutettu. Myöskään kansainvälisen TNM-levinneisyysluokituksen ennustearvo ei ole kielikarsinoomassa yksiselitteinen; esimerkiksi primäärileesion koko ei välttämättä aina korreloi taudin vaikeusasteeseen, sillä metastaaseja voi ilmentua jo primäärituumorin ollessa pienikokoinen ja ne saattavat jäädä huomaamatta kliinisessä tutkimuksessa. Histopatologisista ennustetekijöistä ei myöskään ole kielikarsinooman kohdalla olemassa selkeitä linjauksia. Silti on tutkittu useita yksittäisiä osa-alueita, kuten tuumorin angiogeneesia, apoptoosien määrää, histologista luokittelua sekä muita markkereita. (3, 4)

1.2 Angiogeneesi ja lymfangiogeneesi

Angiogeneesi ja lymfangiogeneesi ovat oleellisia tekijöitä kielikarsinooman etenemisessä, sekä ennusteessa. Ensisijaisesti imusuonien tiheyttä voidaan pitää hyödyllisenä työkaluna arvioitaessa

potilaan ennustetta. (5) Kuitenkin myös tutkimusten mukaan imusuonien tiheys ei korreloi kaulan alueen imusolmukemetastaasien esiintyvyyteen. (6)

Tutkimusten perusteella Podoplaniinin expressio kielikarsinoomissa korreloi lisääntyneeseen kielikarsinoomien imusolmukematastaaseihin sekä huonontuneeseen ennusteeseen. (7) Lisäksi kyseisen proteiinin expressio saattaa liittyä kasvaimen aggressiivisuuteen. (5)

CD34 expressio suuontelon kasvaimissa on tutkimusten mukaan todettu lisäävän riskiä imusolmukemetastaaseille. (8, 9)

1.3 Tutkimuksen tavoitteet

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää kuinka imusuonien ja hiussuonien tiheydet vaihtelevat kielikarsinoomien ja näiden metastaasien välillä. Lisäksi on tavoitteena selvittää onko imusuonitiheyksissä eroa malignien ja premalignien tuumoreiden välillä.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Aineisto

Tutkimusaineisto koostui Tampereen yliopistollisessa sairaalassa vuosina 1994–2007 resekoiduista suun ja kaulan alueen kudoksetäytteistä (Fimlab). Näytteitä oli otettu kielestä, tonsilloista, nielusta, suun limakalvoilta sekä kaulan alueen imusolmukkeista, potilaan taudista riippuen. Kunkin näytteen lopullisena diagnoosina oli joko hyperplasia, dysplasia tai karsinooma. Imusolmukenäytteet liittyivät aina kullakin potilaalla johonkin edellä mainituista diagnooseista, ja kustakin imusolmukenäytteestä joko löytyi metastaasi tai ei.

Alkuperäisen aineiston koko oli 183 suun alueen näytettä. Aineistosta jätettiin pois 26 näytettä, koska näytteitä vastaavia parafiiniblokkeja ei ollut mahdollista saada arkistosta. Lisäksi kolme näytettä poistettiin aineistosta huonon laadun vuoksi. Tonsilla-, nielu- ja suun limakalvon näytteet sekä niihin liittyneet imusolmukenäytteet (18 kpl) jätettiin myös pois lopullisesta aineistosta. Karsinoinnin jälkeen aineiston lopullinen koko oli 136 näytettä. Näistä 99 oli kielinäytteitä, joista 66 oli diagnosoitu karsinoomaksi ja 30 hyperplasiaksi, sekä 3 dysplasiaksi. Kielikarsinoomanäytteisiin liittyviä imusolmukenäytteitä oli yhteensä 37, joista 23:ssa oli metastaasi ja 14:ssä ei ollut metastaasia. 29 kielikarsinoomanäytteeseen ei liittynyt lainkaan imusolmukenäytettä. Potilaita

aineistossamme oli 98, joista 44 (45 %) oli miehiä ja 54 (55 %) naisia. Potilaiden keski-ikä oli 60 vuotta (18–92 vuotta).

2.2 Menetelmät

Potilaista otetut näytteet oli resekoinnin jälkeen fiksoitu aluksi 10 %:lla formaliinilla, minkä jälkeen ne oli käsitelty tavalliseen tapaan kudosprosessorissa ja valettu parafiiniblokeiksi. Kunkin kudoksenäytteen parafiiniblokista leikattiin mikrotomilla 4 µm:n paksuisia leikkeitä, jotka poimittiin näytelasille ja deparafinoitiin sekä esikäsiteltiin immunovärjäysautomaatissa. Nämä näytteet värjättiin Podoplaniinilla, D2-40:llä ja CD-34:llä. Lopuksi näytteet vietiin nousevan alkoholisarjan läpi (aqua 2 min., etanoli 70 % 2 min., etanoli 94 % kahdesti 2 min., absoluuttinen etanoli kolmesti 2 min., ksyleeni kolmesti 5 min.), ja peitettiin peitinlasilla.

Näytteet evaluoitiin käyttäen hyväksi Weidnerin metodia, jota on aiemmissa tutkimuksissa laajimmin käytetty suonien tiheyksiä arvioitaessa. (10) Näytteet arvoitiin siten, että kustakin kielikarsinooma- ja metastaasi-, sekä hyperplasianäytteestä arvioitiin mikroskooppitarkastelussa pienellä suurennoksella viisi hotspottia, joissa oli arviolta eniten suonia. Nämä alueet tarkasteltiin 20x-suurennoksella, jolloin yhden näkymän suonet laskettiin. Tässä vaiheessa D2-40 värjätty näytteet jätettiin pois lopullisesta tutkimuksesta näytteiden värjäytyvyyden poikkeuksellisen vaihtelevuuden vuoksi. Näistä viidestä alueesta laskettiin suonien lukumäärän keskiarvo, joita vertailtiin SPSS 13.0-ohjelmalla.

3 TULOKSET

Tuloksia analysoitaessa näytteet jaettiin ryhmiin joita vertailtiin keskenään. Nämä ryhmät olivat hyperplasia, dysplasia, kielikarsinooma, imusolmukkeen metastaasi ja imusolmuke, jossa ei todettu metastaasia. Ryhmien imu- ja hiussuonien keskiarvoja vertailtiin Kruskal Wallisin testillä. Liksäksi podoplaniinilla värjättyissä näytteissä vertailtiin myös hyperplasioiden ja kielikarsinoomien välisiä eroja keskiarvoissa Mann-Whitneyn testillä.

3.1 Angiogeneesi

Aineiston CD34:llä värjättyistä näyteistä lopulliseen tilastolliseen vertailuun päätyi 27 (90,0%) hyperplasiaa, 3 dysplasiaa (100%), 57 (86,4%) kielen levyepiteelikarsinoomaa, 17 (73,9%) imusolmuketta, joissa oli todettu metastaasi ja 10 (71,4%) imusolmuketta, joissa ei todettu

metastaasia. Hyperplasioissa hotspottien hiussuonten lukumäärän keskiarvo oli 25,1 ja mediaani 26,8 pinta-ala yksikköä kohden. Keskihajonta oli 10,6. Dysplasioissa keskiarvo oli 25,3 ja mediaani 27,4. Keskihajonta oli 15,1. Kielen levyepiteelikarsinoomissa keskiarvo oli 23,1 ja mediaani 22,8. Keskihajonta oli 7,9. Imusolmukkeissa, joissa todettiin metastaasi, keskiarvo oli 25,1 ja mediaani 24,0. Keskihajonta oli 12,6. Imusolmukkeissa, joissa ei todettu metastaasia, keskiarvo 22,0 ja mediaani 20,8. Keskihajonta oli 8,2.

Kruskal-Wallis testissä ei todettu tilastollisesti merkittävää eroa hiussuonten tiheyksien välillä eri näyteryhmissä ($p = 0,910$).

3.2 Lymfangiogeneesi

Aineiston podoplaniinilla värjätyissä näyteistä lopulliseen tilastolliseen vertailuun päätyi 24 (80,0%) hyperplasiaa, 3 dysplasiaa (100%), 47 (71,2%) kielen levyepiteelikarsinoomaa, 13 (56,5%) imusolmuketta, joissa oli todettu metastaasi ja 11 (78,6%) imusolmuketta, joissa ei todettu metastaasia. Hyperplasioissa hotspottien imusuonten lukumäärän keskiarvo oli 8,8 ja mediaani 5,4 pinta-ala yksikköä kohden. Keskihajonta oli 12,0. Dysplasioissa keskiarvo oli 4,6 ja mediaani 6,0. Keskihajonta oli 4,1. Kielen levyepiteelikarsinoomissa keskiarvo oli 8,9 ja mediaani 8,4. Keskihajonta oli 5,9. Imusolmukkeissa, joissa todettiin metastaasi keskiarvo oli 7,6 ja mediaani 7,0. Keskihajonta oli 5,4. Imusolmukkeissa, joissa ei todettu metastaasia keskiarvo 6,1 ja mediaani 5,5. Keskihajonta oli 3,1.

Kruskal-Wallis testillä ei todettu tilastollisesti merkittävää eroa näytteiden imusuonien tiheyksien välillä ($p = 0,362$). Myöskään Mann-Whitneyn testillä ei havaittu tilastollisesti merkittävää eroa hyperplasioiden ja kielen levyepiteelikarsinoomien imusuonien tiheyksien välillä ($p = 0,156$).

4 POHDINTA

Kielikarsinoomassa etäpesäkkeiden kehittymisen ja taudin etenemisen tutkiminen on perusteltua, sillä levinnyt syöpä voi kehittyä salakavalasti jo varhain ilman merkittäviä oireita. Angiogeneesin ja lymfangiogeneesin merkitystä tähän liittyen on tutkittu, koska tämä tarjoaisi myös väylän mahdollisten leviämistä ehkäisevien sekä tautia hillitsevien lääkkeiden kehittämiseen ja tutkimiseen. Angiogeneesiä hillitseviä lääkkeitä on jo käytössä ja näistä on näyttöä mm. ei-pieni soluisen keuhkosyövän hoidossa. (11, 12) Tämän vuoksi kielen levyepiteelikarsinooman angio- ja

lymfangiogeneesin tutkiminen on tärkeää, sillä edelleenkin on hyvin ristiriitaista tietoa siitä, kuinka imu- ja hiussuonien tiheydet vaikuttavat potilaan ennusteeseen ja millainen merkitys niillä on taudin etenemiseen. (6, 7, 8, 9, 13)

Tutkimuksemme viittaa siihen, ettei malignien ja premalignien tuumoreiden välillä ole merkitsevää eroa hiussuonten tai imusuonten tiheyksissä, mihin viittaavat myös toiset tutkimukset. (6) Kuitenkin on myös tutkimustuloksia, joissa on todettu, että lisääntynyt angiogeneesi ja CD34 expressio on yhteydessä kielikarsinoomien metastaaseihin. (8, 9) Podoplaaniinin expressio on myös tutkitusti yhteydessä huonoon ennusteeseen, kuten myös imusolmukemetastaaseihin kielen levyepiteelikarsinoomissa. (7)

Tutkimuksemme lähtökohtana oli oletus, että hiussuonien ja imusuonien tiheys olisi suurempi maligneissa tuumoreissa verrattuna hyperplasioihin. Samoin oletimme, että olisi ollut imusolmukkeissa, joissa todettiin metastaasi verrattuna niihin imusolmukkeisiin, joissa ei metastaasia todettu. Kuitenkin tutkimustulostemme perusteella imusuonien tiheydessä ei tilastollista eroa ole osoitettavissa kielen levyepiteelikarsinoomien ja hyperplasioiden välillä, kuten ei myöskään ole metastaattisten ja ei-metastaattisten imusolmukkeiden välillä. Myöskään hiussuonien tiheyksillä ei tutkimuksessamme havaittu olevan tilastollista eroa vertailuissa ryhmissä. Vastaavanlaisia tuloksia on saatu aiemmissa tutkimuksissa. (6, 13) Nämä edellä mainitut tutkimukset ovat ristiriidassa niin ikään samojen aihealueita käsittelevien tutkimusten kanssa. (8, 9)

Tutkimustulosten ristiriitaisuus saattaisi selittyä sillä, että erityisen aggressiivisten kasvainten kyky tuottaa hiussuonten tuotantoa lisääviä kasvutekijöitä ei riitä ylläpitämään hiussuonimuodostusta, jolloin kasvaimen nekroottisten alueiden määrä lisääntyy. Tästä syystä voi syntyä harha todellisuutta pienemmästä suonitiheydestä.

On myös arvioitu, että lähinnä ensisijaisesti metastasointi tapahtuisi suun levyepiteelikasvaimissa lamina propriassa sijaitsevien, jo ennen kasvainta olemassa olevien, dilatoituneiden imusuonien kautta. Tältä pohjalta on oletettu, että imusuonilla, joita on hyvin runsaasti siellä missä kasvain invasoi terveeseen kudokseen, ei olisi niin suurta merkitystä kasvaimen metastasoimiseen. (14) Tutkimuksessa havaitsimme vastaavaan viittaavaa ilmiötä. Suurelta osin näytteissä havaittu malignien solujen esiintyminen imusuonissa havaittiin juuri vastaavanlaisissa dilatoituneissa imusuonissa.

Jatkossa tulisi tutkia laajemmin angiogeneesin ja lymfangiogeneesin vaikutuksia. Esimerkiksi näiden vaikutusta 5 vuoden elossaoloennusteeseen, sekä metastaasien todennäköisyyteen ja erityisesti mahdollisiin relapseihin potilailla joilla todetaan kielen levyepiteeli karsinoma.. Tutkimuksen arvoa lisäisi, jos samassa yhteydessä arvioitaisiin angiogeneesin kasvutekijöitä, joita osassa muista tutkimuksissa on tutkittu. Lisäksi olisi syytä tutkia, kuinka kasvaimen metastasoimiseen ja relapseihin vaikuttaa primäärituumorissa havaittu malignien solujen invaasio dilatoituneisiin imusuoniin.

5 LÄHTEET

1. Grenman R. Tietoa potilaalle: Suusyöpä (kielisyöpä, huulisyöpä ja suuontelon syöpä). Lääkärin käsikirja Duodecim 9.10.2012.
2. Suusyövän Käypä hoito –suositus 9.1.2012.
3. Bello IO, Soini Y, Salo T: Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). *Oral Oncol.* 2010, 46(9):630-5
4. Bello IO, Soini Y, Salo T: Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (II). *Oral Oncol.* 2010, 46(9):636-43
5. de Sousa SF, Gleber-Netto FO, de Oliveira-Neto HH, Batista AC, Nogueira Guimarães Abreu MH, de Aguiar MC: Lymphangiogenesis and podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma and the associated lymph nodes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012, 20(6):588-94.
6. Okada Y: Relationships of cervical lymph node metastasis to histopathological malignancy grade, tumor angiogenesis, and lymphatic invasion in tongue cancer. *Odontology.* 2010, 98(2):153-9.
7. Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, Mao L: Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer.* 2006, 107(3):563-9.
8. Kademani D, Lewis JT, Lamb DH, Rallis DJ, Harrington JR: Angiogenesis and CD34 expression as a predictor of recurrence in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009, 67(9):1800-5.
9. Bunget A, Fronie A, Afrem E, Corlan Puşcu D, Manolea H, Dan AR, Coman M, Nimigean VR: Microscopic aspects of angiogenesis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2013, 54(3):623-7.
10. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991, 3;324(1):1-8.
11. Okamoto I, Yoshioka H, Takeda K, Satouchi M, Yamamoto N, Seto T, Kasahara K, Miyazaki M, Kitamura R, Ohyama A, Hokoda N, Nakayama H, Yoshihara E, Nakagawa K. J: Phase I clinical study of the angiogenesis inhibitor TSU-68 combined with carboplatin and paclitaxel in chemotherapy-naïve patients with advanced non-small cell lung cancer. *Thorac Oncol.* 2012, 7(2):427-33.
12. Aftab BT, Dobromilskaya I, Liu JO, Rudin CM: Itraconazole inhibits angiogenesis and tumor growth in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2011, 71(21):6764-72.
13. Fernández MM, García-Rozado A, Parente PL: Is microvascular density an independent prognostic factor in squamous cell carcinoma of the tongue? *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2007, 58(8):341-6.
14. Ohno F1, Nakanishi H, Abe A, Seki Y, Kinoshita A, Hasegawa Y, Tatematsu M, Kurita K: Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody: an analysis in comparison with angiogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2007, 36(5):281-9.